

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR04/003024

International filing date: 22 November 2004 (22.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2003-0088489
Filing date: 08 December 2003 (08.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 02 December 2004 (02.12.2004)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

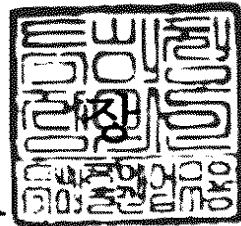
출 원 번 호 : 특허출원 2003년 제 0088489 호
Application Number 10-2003-0088489

출 원 년 월 일 : 2003년 12월 08일
Date of Application DEC 08, 2003

출 원 인 : 씨제이 주식회사
Applicant(s) CJ Corp.

2004년 12월 6일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허 출원 서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.12.08
【발명의 명칭】	균체 재사용에 의한 고수율 자일리톨의 제조방법
【발명의 영문명칭】	METHOD FOR PREPARING XYLITOL WITH HIGH YIELD USING RECYCLING MICROORGANISM
【출원인】	
【성명】	오덕근
【출원인코드】	4-2003-044526-3
【대리인】	
【성명】	박원용
【대리인코드】	9-1999-000503-9
【포괄위임등록번호】	2003-081888-3
【대리인】	
【성명】	이종우
【대리인코드】	9-1998-000393-3
【포괄위임등록번호】	2003-081887-6
【발명자】	
【성명】	오덕근
【출원인코드】	4-2003-044526-3
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김택범
【성명의 영문표기】	KIM, Taek Bum
【주민등록번호】	760309-1462527
【우편번호】	355-010
【주소】	충청남도 보령시 대천동 514-215
【국적】	KR
【심사청구】	청구
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 박원용 (인) 대리인 이종우 (인)

【수수료】

【기본출원료】	20	면	29,000	원
【가산출원료】	3	면	3,000	원
【우선권 주장료】	0	건	0	원
【심사청구료】	9	항	397,000	원
【합계】			429,000	원
【감면 사유】			개인 (70%감면)	
【감면후 수수료】			128,700	원
【첨부서류】			1. 요약서·명세서(도면)_1통	

【요약서】

【요약】

본 발명은 감압식 미세여과 생물반응기를 이용하고, 발효배지의 조성을 자일로스 5~300 g/ℓ, 요소 1~10 g/ℓ, 이인산칼륨 1~10 g/ℓ, 황산마그네슘 0.01~1 g/, MnSO₄·4H₂O 0.1~10 mg/ℓ, CoCl₂·6H₂O 0.1~10 mg/ℓ, NaMoO₄·2H₂O 0.1~10 mg/ℓ, ZnSO₄·7H₂O 0.1~10 mg/ℓ, AlCl₃·6H₂O 0.1~10 mg/ℓ, CuCl₂·2H₂O 0.1~10 mg/ℓ, H₃BO₃ 0.01~5 mg/ℓ, FeSO₄·7H₂O 1~100 mg/ℓ, 아스코르브산 0.1~10 mg/ℓ, 비오텐 1~100 mg/ℓ, 콜린 1~100 mg/ℓ, 엽산 1~200 mg/ℓ, 이노시톨 1~100 mg/ℓ, 니코틴산 1~100 mg/ℓ, p-아미노벤조산 0.1~10 mg/ℓ, 판토텐산 1~100 mg/I, 피리독신 0.1~10 mg/ℓ, 리보플라빈 10~1000 mg/ℓ, 티아민 1~100 mg/ℓ로 하여 높은 생산성으로 자일리톨을 반복 생산하는 방법을 특징으로 하는 고수율 자일리톨의 제조방법을 제공한다.

【대표도】

도 5

【색인어】

감압식, 미세여과, 생물반응기, 발효배지, 고수율, 자일리톨

【명세서】

【발명의 명칭】

균체 재사용에 의한 고수율 자일리톨의 제조방법 {METHOD FOR PREPARING XYLITOL WITH HIGH YIELD USING RECYCLING MICROORGANISM}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 캔디다 트롭피칼리스를 본 발명의 화학 배지에서 유가식 배양을 하고, 자일리톨의 생산량을 시간별로 측정하여 그래프로 나타낸 것이고,

도 2는 캔디다 트롭피칼리스를 복합배지에서 유가식 배양을 하고, 자일리톨의 생산량을 시간별로 측정하여 그래프로 나타낸 것이며,

도 3은 본 발명의 화학 배지에서 캔디다 트롭피칼리스를 1차 배양하고, 원심분리로 균체를 재사용하여 배양하고, 생산한 자일리톨을 시간별로 측정하여 그래프로 나타낸 것이고,

도 4는 본 발명의 바람직한 실시예에 사용되는 균체 재사용에 의한 고수율 자일리톨의 제조장치의 계략도를 나타낸 것이며,

도 5는 본 발명의 화학 배지에서 캔디다 트롭피칼리스를 1차 배양하고, 감압식 미세여과관으로 균체를 재사용하여 배양하고, 생산한 자일리톨을 시간별로 측정하여 그래프로 나타낸 것이고,

도 6은 복합배지에서 캔디다 트롭피칼리스를 1차 배양하고, 감압식 미세여과관으로 균체를 재사용하여 배양하고, 생산한 자일리톨을 시간별로 측정하여 그래프로 나타낸 것이며,

도 7은 본 발명의 화학 배지에서 캔디다 트롭피칼리스를 1차 배양한 다음, 가압식 미세여과관으로 균체를 재사용하여 배양하고, 생산한 자일리톨을 시간별로 측정하여 그래프로 나타낸 것이다.

<도면의 주요부분에 대한 부호의 간단한 설명>

10... 생물반응기	20... 이송펌프
30... 미세여과관	32... 실관막
40... 흡입펌프	50... 배양여액 탱크
60... 브로워	11, 31... 공기 출입구
12, 32... 공기 출입구	

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<14> 본 발명은 감압을 사용하여 미세여과 생물반응기에서 균체를 농축하고 재사용함으로써 자일로스 (xylose)로부터 자일리톨 (xylitol)을 높은 생산성으로 반복적으로 얻는 방법에 관한 것이다.

<15> 자일리톨은 1891년 화학자 에밀 피셔 (Emil Fisher)에 의하여 발견되어, 1960년부터 감미료로서 사용되고 있는 오탄당 알코올이다. 또한, 자일리톨은 과일, 채소 및 버섯 등의 자연에서 소량 존재하고 포유동물의 탄수화물 대사과정 중에 존재한다. 자일리톨은 당도가 설탕과 같고 용해될 때 열 감소가 일어나는 특성으로 인하여 입안에서 느끼는 청량감이 커서 제과제품의 무설탕 원료로 사용되고 있고 섭

취후 대사과정이 인슐린 (insulin)과 무관하기 때문에 당뇨병 환자의 대용당으로 이용 할 수 있다.

<16> 자일리톨은 충치발생과 관련된 스트렙토코커스 뮤탄스 (*Streptococcus mutans*)의 생육을 저해하여 충치발생을 억제한다고 보고되고 있어 치약 등에 사용되고 있다. 또한, 매일라드 (Maillard) 반응에 대하여 화학적으로 무반응 하다는 것도 주목할만한 특성이며 단당류이기 때문에 설탕과 달리 전화될 수 없으며, 따라서 변질의 우려 없이 산성 환경에서도 사용할 수 있으며, 끓는 점이 95°C이기 때문에 변성되지 않고 끓는 점에 도달할 수 있어 당의 (sugar-coating)로 사용할 경우 특별히 물에 용해시켜 사용해야 할 필요가 없다는 장점을 지닌다.

<17> 자일리톨은 식물성 원료인 자작나무, 옥수수 속대 등의 반섬유소 가수분해물 (hemicellulose hydrolysate)을 화학적으로 환원시키거나 미생물로 생물학적 전환에 의해서 산업적으로 생산하고 있다. 그러나, 화학적 방법은 자일로스 또는 자일리톨과 반섬유소 부분에서 생기는 다른 가수분해물들과의 분리와 경제가 어렵고 그 수율도 50-60% 정도로 낮다. 또한 알칼리를 이용한 고온 고압의 반응이므로 위험성과 폐기물 문제가 존재하는 단점이 있다. 이러한 단점을 해결하기 위하여 미생물에 의한 자일리톨 생산방법이 산업적으로 개발되었다. 미생물에 의한 방법은 고가의 방법이 아니고 선별적으로 자일리톨만 전환시킬 수 있어 반응후의 자일리톨의 분리 경제과정을 매우 용이하게 할 수 있으나, 그 생산성이 2.0~3.0 g / l · h로 낮고 균체를 1회 밖에 사용할 수 없는 단점이 있다. 그렇기 때문에, 종래에는 배양이 끝나면, 재 배양을 위한 세척 및 살균 등의 배양 전단계 준비로 인하여 생산 단가의 상승 요인이 되고 있다.

<18> 또한, 칸디다속 균체를 사용하여 자일리톨을 제조함에 있어서, 탄소원으로 자일로스나 자일로스가 많이 함유된 반섬유 가수분해물이 주로 사용되고, 질소원으로는 효모 추출물, 맥아 추출물, 대두박 등 여러가지 비타민이 함유된 복합 질소원을 사용해야 하는 것으로 알려져 있다. 이는 칸디다 속 균체의 영양요구성이 비교적 복잡하여 화학 합성 배지 (chemical synthetic medium)에서는 자일리톨을 거의 생산하지 못하기 때문이다.

<19> 이에, 복합배지 사용으로 인한 배지 비용의 상승이 자일리톨 원가 상승의 요인이 되고 있는 실정이다.

<20> 따라서, 본 발명자들은 상술한 미생물 생산방법의 단점을 극복하기 위하여 화학적으로 정의된 배지를 사용하고도 균체를 배양하여 자일리톨을 생산할 수 있게 하면서, 반응이 완료된 배양액에서 균체를 분리, 농축하여 재사용하는 재순환 배양방법을 개발하고, 이를 자동화 연속 배양 공정에 적용함으로써, 단일 배양공정으로 인한 생산 비용을 절감하면서, 자일리톨을 반복적으로 얻을 수 있게 하여 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<21> 상기한 바와 같은 종래의 문제점을 인식하여, 본 발명은 이를 개선하기 위해 안출된 것으로, 그 목적은 칸디다 속의 균체를 배양하여 자일리톨을 얻을 수 있는 화학적으로 정의된 배지를 제공하는 것이다.

<22> 또한, 본 발명의 다른 목적은 균체를 이용한 자일리톨의 제조방법에 있어서, 배양 후, 배양액에서 균체와 배양여액을 분리하여 균체를 농축하고, 농축된 균체를 재순환하여 배양하는 고수율의 자일리톨 제조방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<23> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 요소 1~10 g/ℓ, 이인산칼륨 1~10 g/ℓ, 황산마그네슘 0.01~1 g/, MnSO₄·4H₂O 0.1~10 mg/ℓ, CoCl₂·6H₂O 0.1~10 mg/ℓ, NaMoO₄·2H₂O 0.1~10 mg/ℓ, ZnSO₄·7H₂O 0.1~10 mg/ℓ, AlCl₃·6H₂O 0.1~10 mg/ℓ, CuCl₂·2H₂O 0.1~10 mg/ℓ, H₃BO₃ 0.01~5 mg/ℓ, FeSO₄·7H₂O 1~100 mg/ℓ, 아스코르브산 0.1~10 mg/ℓ, 비오틴 1~100 mg/ℓ, 콜린 1~100 mg/ℓ, 피리독신 0.1~10 mg/ℓ로 이루어진 칸디다속 균체 종배양용 배지 조성물을 제공한다.

<24> 또 다른 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 캔디다속 균체를 배양하여 자일리톨을 제조함에 있어서, 상기 균체를 자일로스 함유 배지에 접종하여 생물반응기에서 배양한 다음, 배양액은 배출하고, 배지는 생물 반응기에 연속적으로 주입하면서, 상기 배출된 배양액은 균체와 배양여액으로 분리하여, 상기 분리한 균체는 생물반응기로 재순환시켜 배양을 하고, 상기 배양여액에서는 자일리톨을 회수하는 순환식 배양방법에 의한 고수율 자일리톨의 제조방법을 제공한다.

<25> 본 발명에서 상기 칸디다속 균체는 캔디다 트롭피칼리스 (*Candida tropicalis*) 및 그 돌연변이주를 사용하는 것이 바람직하다.

<26> 본 발명의 배양에서 사용되는 배지는 상기 화학적으로 정의된 배지 (이하 화학 배지) 또는 효모 추출물, 맥아 추출물, 대두박 등의 복합 질소원을 사용한 복합 배지

를 사용할 수 있으나, 생산비용 등 경제적인 이유로 상기의 화학 배지를 사용하는 것이 바람직하다. 이때, 탄소원으로는 자일로스 또는 자일로스를 다량 함유한 반섬유소 가수분해물을 사용할 수 있다.

<27> 그리고, 상기 화학적 배지에 균체의 생육을 원활하게 하기위해 엽산 1~200 mg/ ℓ , 이노시톨 1~100 mg/ ℓ , 니코틴산 1~100 mg/ ℓ , p-아미노벤조산 0.1~10 mg/ ℓ , 판토텐산 1~100 mg/ ℓ , 리보플라빈 10~1000 mg/ ℓ , 티아민 1~100 mg/ ℓ 를 더 포함하여 사용할 수 있다.

<28> 또한, 본 발명은 유가식 배양 또는 회분식 배양방법을 적용한다.

<29> 그리고, 유가식 배양방법을 선택할 경우에는 탄소원인 자일로오스 농도가 배지 기준으로 40~50g/ ℓ 가 되게 단계적으로 추가하여 배양하는 것이 바람직하다. 이때, 교반은 400~600rpm의 속도로 한다.

<30> 한편, 본 발명의 배양에서 상기 배출된 배양액은 감압식 미세여과관 (Microfiltration system using vacuum pressure) 또는 원심분리기를 사용하여 균체와 배양여액으로 분리하는 데, 특히 자동화 시스템을 활용하기 위해서는 감압식 미세여과관을 사용하는 하는 것이 바람직하며, 상기 감압식 미세여과관은 생물 반응기와 별도로 부착하여 사용할 수 있고 생물 반응기내에 설치하여 사용할 수도 있다.

<31> 그리고, 상기 배양액에서 균체와 배양여액을 분리하면 균체가 농축되는데, 농축된 균체를 재순환하여 사용할 때에는 배지 내에서의 농도가 10 내지 100g/ ℓ 가 되게 하여 사용하는 것이 바람직하다.

- <32> 이하, 본 발명에 의한 고수율 자일리톨의 제조방법의 바람직한 실시예를 첨부된 도면을 참조하여 상세히 설명하기로 한다.
- <33> 단, 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- <34> 우선, 도 4에서와 같이, 감압식 미세여과기를 장착한 생물반응기 장치를 통하여, 본 발명의 전체적인 제조 공정을 간략히 설명하기로 한다.
- <35> 본 발명은 생물 반응기 (Bioreactor, 10)에서 균체를 배양하고, 배양이 완료된 배양액은 이송펌프 (peristaltic pump, 20)를 사용하여 미세여과관 (30)에 배출시키고, 이때 배양액이 주입된 미세여과관 (30)은 원활한 여과를 위하여 하부 공기 출입구 (32)로 공기를 강제로 주입하면서 미세여과관 양쪽 끝에 고정된 실관막 (Hollow fiber membrane, 32)에 연결된 흡입펌프 (40)를 작동시키면, 상기 미세여과관 내부가 감압되고, 압력차가 발생되어 상기 배양액이 미세여과관 양쪽 끝에 고정된 실관막 (32)을 통과하게 된다. 이때, 상기 실관막을 통과하지 못하는 균체는 실관막 (32) 하단부에 놓축되고, 상기 놓축된 균체는 이송펌프 (20)를 사용하여 생물반응기 (10)로 반송시켜 재배양하고, 실관막을 통과한 배양액은 다시 흡입펌프 (40)에 의해 배양액 탱크 (Broth tank, 50)로 이동된 후, 통상의 정제 방법을 통하여 자일리톨을 수득한다.
- <36> 한편, 여과가 끝난 미세여과관 (30)은 반대방향으로 실관막 (32)에 약간의 새로운 배지를 첨가하여 붙어있는 균체를 떨어뜨린 후 이송펌프 (20)를 통하여 생물반응기 (10)로 이송시키고, 상기 실관막에 다시 공기를 불어넣어 막을 원상태로 돌아가게 한다. 그러면서 새로운 배지를 생물반응기 (10)에 주입하여 다시 배양을 수행한다.

<37> 배양의 상태는 기질과 생성물인 자일로스와 자일리톨의 농도를 측정하고, 균체농도를 건조중량으로 환산하여 판단한다. 이때, 균체농도는 표준곡선을 이용한 탁도계에 의해 측정하는 것이 바람직하다.

<38> [실험예]

<39> 자일로스와 자일리톨의 농도는 Sugar-Pak I 칼럼 (Millipore, USA)이 장착된 HPLC (Shimadzu C-R6A, Japan)의 Refractive Index Detector (Shimadzu RID-6A, Japan)를 이용하여 측정하였다. 이때, 용매는 물을 사용하였고, 온도는 70°C이고, 유속은 0.6 mL/min 이였다. 균체농도는 탁도계를 이용하여 600nm에서 혼탁도를 측정하여 미리 측정한 표준곡선을 이용하여 건조중량으로 전환하였다. 용존산소농도는 Ingold사 (Swiss, polarographic type)의 용존산소전극을 사용하여 측정하였다.

<40> [실시예 1] 화학적 배지

<41> 종 배양 : 공시의 균주인 캔디다 트롭피칼리스 KCTC 7221를 성장배지 50mL가 들어있는 250mL 플라스크에 접종하여 240rpm, 30°C로 하여 10시간 배양하였다.

<42> 본 배양 : 상기 종 배양액을 자일로스 150 g/L, 요소 5 g/L 이인산칼륨 5 g/L, 황산마그네슘 0.2 g/L, 금속염 ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 7 mg/L, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 4 mg/L, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 2 mg/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 mg/L, $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 1 mg/L, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 2 mg/L, H_3BO_3 0.5 mg/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 40 mg/L), 비타민 (아스코르브산 5 mg/L, 비오텐 10 mg/L, 콜린 25 mg/L, 엽산 50 mg/L, 이노시톨 10 mg/L, 니코틴산 25 mg/L, p-아미노벤조산 1 mg/L, 판토텐산 5 mg/L, 피리독신 1 mg/L, 리보플라빈 100 mg/L, 티아민 25 mg/L)으로 이루어진 화학적으로 정의된 배지가 2L 가 들어있는 7 L 용 발효

조(바이오틀론 주식회사)에 넣어 배양하였다. 발효과정 중에 510 g의 자일로스가 함유된 1 ℓ의 용액을 연속적으로 추가하여 최종배양액의 부피를 3 ℓ(총 첨가된 자일로스의 농도는 270 g/ℓ에 해당)가 되는 유가식 배양을 하였다. 교반속도를 400 rpm으로 하고 pH는 발효 전 과정 동안 5.0으로 조절하였고 배양온도는 30°C이었고 통기량은 1.0 vvm으로 조절하였다. 시간에 따른 자일리톨의 생산은 도 1에 나타내었다. 이러한 방법으로 270 g/ℓ의 자일로스로부터 배양시간 120 시간만에 240 g/ℓ의 자일리톨을 얻었다. 이러한 결과는 자일로스에 대한 자일리톨의 수율 89%와 자일리톨의 생산성 2.0 g/ℓ·h에 해당되는 것으로 값싼 화학적 제한 배지로 자일리톨 생산을 대체할 수 있다는 것을 알 수가 있었다.

<43> [비교예 1] 복합 배지

<44> 종 배양 : 공시의 균주인 캔디다 트롭피칼리스 KCTC 7221를 성장배지 50mℓ/가 들어있는 250mℓ 플라스크에 접종하여 240rpm 30°C로 10시간 배양하였다.

<45> 본 배양 : 종 배양액을 자일로스를 150 g/ℓ, 효모추출액 10 g/ℓ 이인산칼륨 5 g/ℓ, 황산마그네슘 0.2 g/ℓ으로 이루어진 복합배지가 2 ℓ 들어있는 7 ℓ 용 발효조에 넣어 배양하였다. 발효과정 중에 510 g의 자일로스가 함유된 1 ℓ의 용액

을 연속적으로 추가하여 최종배양액의 부피를 3 ℓ (총 첨가된 자일로스의 농도는 270 g / ℓ에 해당)가 되는 유가식 배양을 하였다. 교반속도를 400 rpm으로 하고 pH는 발효 전 과정 동안 5.0으로 조절하였고 배양온도는 30°C이었고 통기량은 1.0 vvm으로 조절하였다. 시간에 따른 자일리톨의 생산은 그림 2에 나타내었다. 이러한 방법으로 270 g / ℓ의 자일로스로부터 배양시간 108 시간만에 230 g / ℓ의 자일리톨을 얻었다. 이러한 결과는 자일로스에 대한 자일리톨의 수율 85%와 자일리톨의 생산성 2.1 g / ℓ · h에 해당되는 결과를 얻었다(도 2 참조).

<46> [실시예 2] 원심분리를 이용한 균체의 재사용 순환 배양

<47> 실시예 1의 화학 배지에서 배양을 한 후, 자일로스가 고갈되기 직전에 균체를 5,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 새로운 화학 배지 2 ℓ에 접종하여 재사용하였다. 이때, 배양조건은 상기 실시예 1과 동일하게 하였으며, 자일로스와 자일리톨의 농도는 상기 실험예의 방법을 실시하여 확인하였다.

<48> 균체를 14번 재사용한 결과, 원심분리를 하지 않은 첫 배양은 배양액 2 ℓ에 자일리톨 218g, 생산성 2.3 g / ℓ · h, 자일로스에 대한 자일리톨 수율 74%를 나타내었고, 원심분리를 한 후 14번 배양하여 축적한 총배양액 28 ℓ에서는 자일리톨 3,076g, 생산성 5.4 g / ℓ · h, 자일리톨 수율 82%를 나타내었다(도 3 참조).

<49> 이와같은 결과로, 첫배양과 비교하여 자일리톨의 생산량, 생산성, 및 수율은 각각 14배, 2.4 배, 8%가 증가하였음을 알게 되었다.

<50> 따라서, 본 발명의 균체 재사용으로 인한 자일리톨의 제조 효율성이 종래의 1회 성 회분식 배양방법보다 감소하지 않고 오히려 월등히 우수함을 알 수 있었다.

- <51> [실시예 3] 감압식 미세여과관을 이용하고 균체의 재사용 순환배양(화학배지)
- <52> 실시예 1의 화학 배지에서 생물배양기에서 배양을 한 후, 자일로스가 고갈되기 직전에 배양액을 생물반응기에 부착된 감압식 미세여과관에 이송하여 사용한 균체와 배양액을 분리하고, 새로운 화학 배지 2 ℥를 주입한 생물 반응기에 상기 분리한 균체를 반송하여 재배양하였다. 배양조건은 상기 실시예1과 동일하게 하였다. (도 4 참조)
- <53> 이때, 사용한 감압식 미세여과관에는 일본 미쓰비시 레이온사에서 제조된 공극이 $0.45\mu\text{m}$ 이고 폴리에틸렌 재질인 실관막 (hollow fiber membrane)을 미세 여과관 양 끝의 실리콘 튜브에 연결하고 부착시킨 다음, 펌프를 이용하여 감압 여과를 하여 사용하였으며, 자일리톨의 농도는 상시 실험예의 방법을 수행하여 확인하였다.
- <54> 그 결과, 미세여과를 하지 않은 첫 배양은 배양액 2 ℥에 자일리톨 194 g, 생산성 2.0 g/ℓ-h, 자일로스에 대한 자일리톨 수율 72%를 나타내었고 미세여과를 한 후의 8번 배양에서는 축적한 총배양액 16 ℥에서 자일리톨은 2,026 g, 생산성 5.8 g/ℓ-h, 자일리톨 수율 87%를 나타내어, 첫배양과 비교하여, 각각 10.4 배, 2.9 배, 15% 증가하였다(도 5 참조).
- <55> [비교예 2] 감압식 미세여과관을 이용한 균체의 재사용 순환배양(복합배지)
- <56> 배양조건은 실시예 1과 같고, 비교예 1에 기재된 복합 배지에서 배양한 다음, 자일로스가 고갈되기 직전에 배양액을 생물반응기에 부착된 감압식 미세여과관에 이송하여 사용한 균체와 배양액을 분리하고, 새로운 복합 배지 2 ℥를 주입한 생물

반응기에 상기 분리한 균체를 반송하여 재배양하였다. 이때 사용한 감압식 미세여과관은 상기 실시예 3과 같다.

<57> 미세여과를 하지 않은 첫 배양은 배양액 2ℓ에 자일리톨 118 g, 생산성 2.5 g/ℓ-h, 자일로스에 대한 자일리톨 수율 79%를 나타내었고 미세여과를 한 후의 7번 배양에서는 축적된 배양액 14ℓ에서 자일리톨이 972 g, 생산성 5.4 g/ℓ-h, 자일리톨 수율 85%를 나타내어 각각 8.2 배, 2.2 배, 6% 증가하였다(도 6 참조).

<58> 이와같이, 상기 실시예 3과 비교예 2를 비교한 결과, 복합배지보다 화학 배지가 순환배양에서 더 우수하다는 것을 알 수가 있었다.

<59> [비교예 3] 가압식 미세여과관을 이용한 균체의 재사용 순환배양(화학배지)

<60> 실시예 1의 배양조건과 화학 배지에서 배양한 후, 자일로스가 고갈되기 직전에 가압식 미세여과기 (Amersham Biosciences, CFP-6-D-4MA, 공극 0.65μm)를 이용하여 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 배양균체는 재사용하여 배양하였고, 배양여액을 회수하여, 배앵여액 내의 자일리톨 농도를 측정하였다.

<61> 도 7에서 나타난 바와 같이, 미세여과를 하지 않은 첫 배양은 배양액 2ℓ에 자일리톨 110 g, 생산성 2.3 g/ℓ-h, 자일로스에 대한 자일리톨 수율 73%를 나타내었으나, 가압미세여과를 한 후의 2번 배양에서는 축적된 배양액 4ℓ에 자일리톨이 179 g, 생산성 2.7 g/ℓ-h, 자일리톨 수율 60%를 나타내어 각각 1.6 배, 1.2 배 증가하였으나 수율은 13% 감소한 것을 알 수 있었다.

<62> 따라서, 가압식 미세여과기를 사용할 경우, 균체의 일부가 압력에 의해 파괴되었을 것으로 판단된다.

<63> [실시예 4]

<64> 배양 조건과 배지는 실시예 1과 같고, 다만 배양 배지의 양을 2~5 ℥로 각각 차등하여 배양한 후 감압식 미세여과기를 이용하여 균체를 여러가지 농도로 조절하여 농축하고, 이를 재사용하였다.

<65> 농축된 균체는 새로운 화학 배지 2 ℥에 접종하여 8시간동안 재배양하였고, 균체농도별 자일리톨 총 생산성 및 비생산성을 측정하여 하기 표 1에 나타내었다.

<66> 이때, 총 생산성은 8시간동안 증가된 자일리톨 농도에 8시간을 나누어 구하였, 비생산성은 총생산성에 사용한 균체 농도를 나누어 계산하였다.

<67> 이 결과, 균체농도를 35 g/ℓ로 농축하였을 경우 10.2 g/ℓ·h의 생산성과 85% 수율을 얻어 가장 우수한 것을 알 수 있었다.

<68>

【표 1】

균체농도 (g/l)	수율 (%)	자일리톨 총생산성 (g/l-h)	자일리톨 미생산성 (g/g-h)
10	35	3.4	0.34
15	87	5.0	0.33
20	88	6.4	0.32
25	88	8.0	0.32
30	37	9.4	0.31
35	86	10.2	0.29
40	82	9.3	0.23
50	78	8.0	0.16
회분식 배양	76	2.0	0.33
(대조구)			

<69> 따라서, 표 1에서 보는 바와 같이, 감압식 미세여과기를 사용하여 농축한 균체를 사용할 경우 일반배양법(평균적으로 48시간에 97g/ℓ의 자일리톨이 생성되어 총 생산성이 2.0g/ℓ-h이다.)보다 5배의 높은 생산성과 10% 높은 수율로 자일리톨을 생산할 수 있음을 알 수 있었다.

【발명의 효과】

<70> 이상과 같이, 본 발명은 화학적으로 정의된 배지에서 배양을 마친다음, 감압 미세여과 생물반응기나 원심분리기에서 균체를 농축하고, 농축된 균체를 재사용함으로써, 자일로스로부터 높은 수율의 자일리톨을 반복적으로 얻을 수 있는 제조방법을 제공할 수 있다.

<71> 이에, 본 발명은 종래의 발효방법에 비해 자동화 생산공정에 적용할 수 있고, 배양 전공정의 준비단계 비용을 절감할 수 있어서, 대량생산을 하면서 저렴한 생산비용을 갖는 자일리톨을 제공한다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

요소 1~10 g/l, 이인산칼륨 1~10 g/l, 황산마그네슘 0.01~1 g/l,
 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1~10 mg/l, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1~10 mg/l, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1~10 mg/l,
 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1~10 mg/l, $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1~10 mg/l, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1~10 mg/l,
 H_3BO_3 0.01~5 mg/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1~100 mg/l, 아스코르브산 0.1~10 mg/l, 비오텐
1~100 mg/l, 콜린 1~100 mg/l, 피리독신 0.1~10 mg/l로 이루어진 칸디다속 균
체 종배양용 배지 조성물.

【청구항 2】

캔디다속 균체를 배양하여 자일리톨을 제조함에 있어서,

상기 균체를 자일로스 함유 배지에 접종하여 생물반응기에서 배양한 다음, 배양
액은 배출하고, 배지는 생물 반응기에 연속적으로 주입하면서, 상기 배출된 배양액은
균체와 배양여액으로 분리하여, 상기 분리한 균체는 생물반응기로 재순환시켜 배양
을 하고, 상기 배양여액에서는 자일리톨을 회수하는 순환식 배양방법에 의한 고수율
자일리톨의 제조방법.

【청구항 3】

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 칸디다속 균체는 캔디다 트롭피칼리스 및
그 돌연변이주인 것을 특징으로 하는 순환식 배양방법에 의한 고수율 자일리톨의 제
조방법.

【청구항 4】

제 2항에 있어서, 상기 배지는 제 1항에 기재된 화학 배지 또는 복합배지를 사용하는 것을 특징으로 하는 순환식 배양방법에 의한 고수율 자일리톨의 제조방법

【청구항 5】

제 2항에 있어서, 상기 배양은 유가식 배양 또는 회분식 배양을 하는 것을 특징으로 하는 순환식 배양방법에 의한 고수율 자일리톨의 제조방법.

【청구항 6】

제 5항에 있어서, 상기 유가식 배양은 자일로오스 농도가 배지 기준으로 40~50g/ℓ 가 되게 단계적으로 추가하는 것을 특징으로 하는 순환식 배양방법에 의한 고수율 자일리톨의 제조방법.

【청구항 7】

제 2항, 제 4항 내지 제 6항 중 어느 한항에 있어서, 상기 배양은 400~600rpm의 교반 속도로 배양하는 것을 특징으로 하는 순환식 배양방법에 의한 고수율 자일리톨의 제조방법.

【청구항 8】

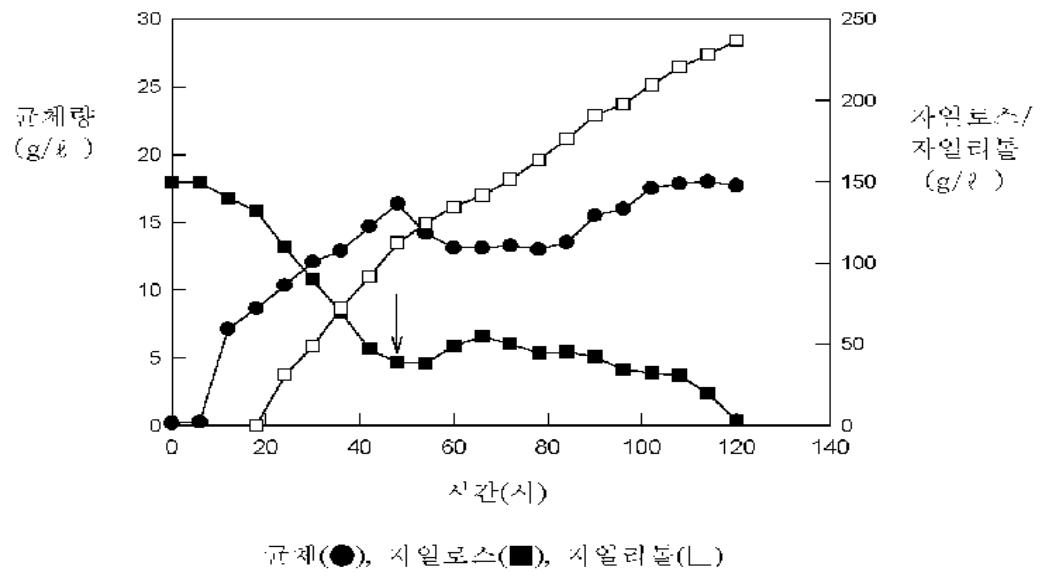
제 2항에 있어서, 상기 배출된 배양액은 감압식 미세여과관 (Microfiltration system using vacuum pressure) 또는 원심분리기로 균체와 배양여액으로 분리하는 것을 특징으로 하는 순환식 배양방법에 의한 고수율 자일리톨의 제조방법.

【청구항 9】

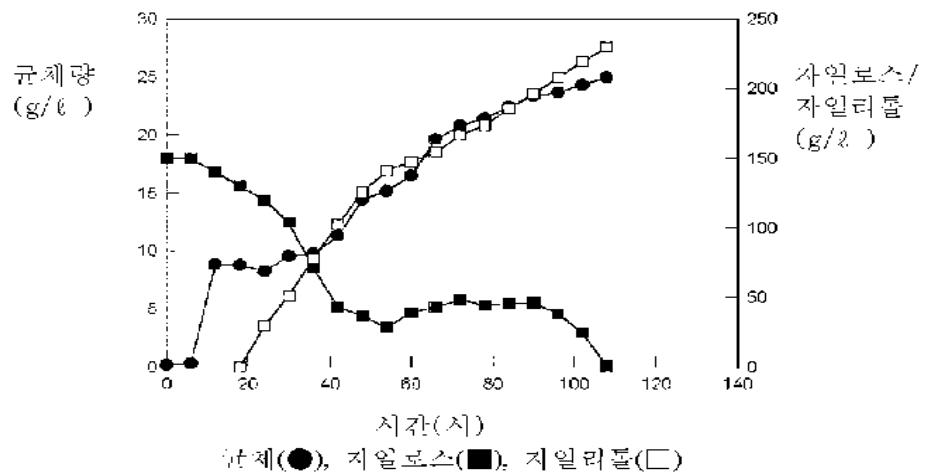
제 2항 또는 제 8항에 있어서, 상기 분리된 균체는 10 내지 100g / ℥ 농도로 농축한 것을 재순환하여 사용하는 것을 특징으로 하는 순환식 배양방법에 의한 고수율 자일리톨의 제조방법 .

【도면】

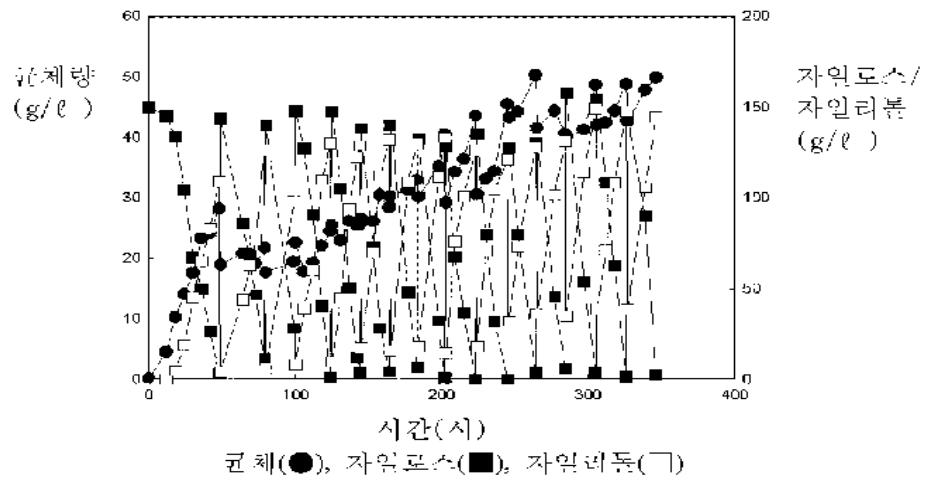
【도 1】



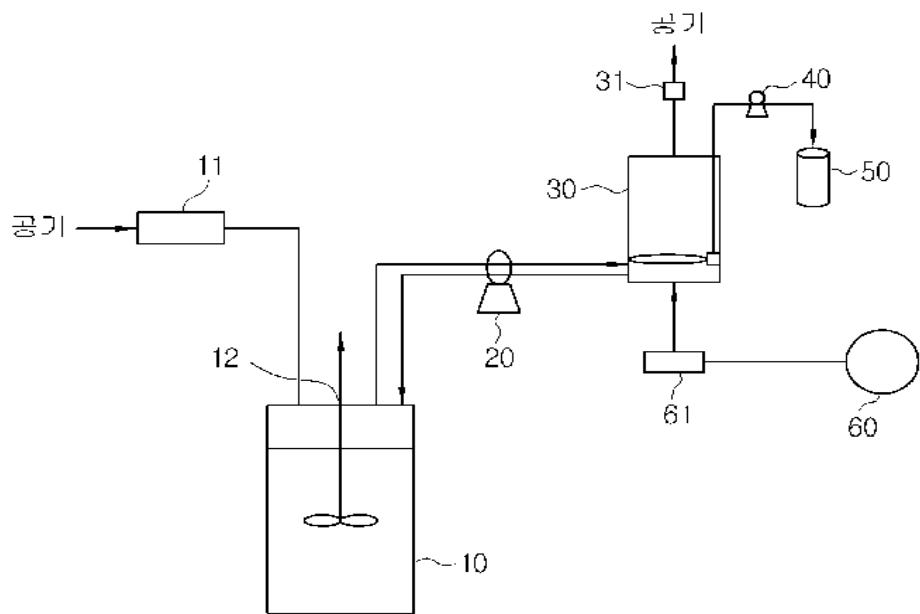
【도 2】



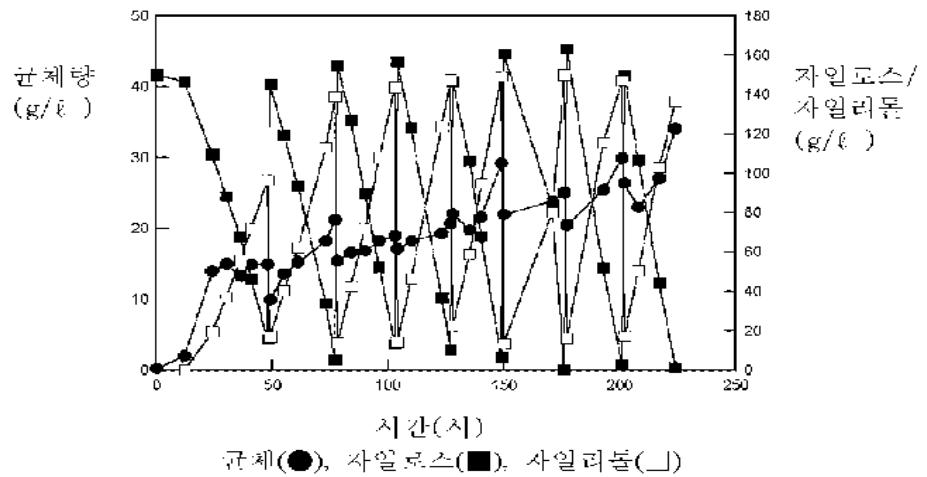
【도 3】



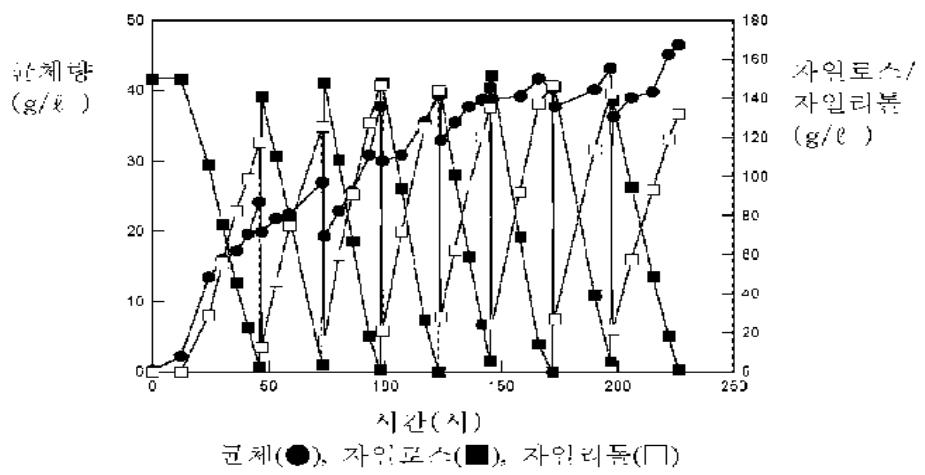
【도 4】



【도 5】



【도 6】



【도 7】

